

## ウサギ肺虚血後再灌流障害モデルにおける インターロイキン-8 (IL-8) の関与

金沢大学医学部外科学第一講座(主任: 渡辺洋宇教授)

関 戸 伸 明

(平成5年2月2日受付)

虚血後再灌流障害は肺移植の成否を左右する重要な問題点であり、好中球はその主要な原因といわれている。肺虚血後再灌流障害時の好中球浸潤に対するインターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) の関与を検討するために、ウサギ肺を用い2時間虚血、3時間再灌流の実験モデルを作製し、さらに抗 IL-8 抗体による再灌流障害軽減の可能性を検討した。気管支肺胞洗浄液 (broncho-alveolar lavage fluid, BALF) および組織ホモジネート中の IL-8 濃度は、2時間再灌流後までに比べ3時間再灌流後に有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。またそれに一致して3時間再灌流後には、BALF 中の好中球の比率および実数が増加し、病理組織学的にも好中球の血管内の凝集および間質、実質への浸潤が認められた。虚血や灌流のみでは IL-8 の上昇も好中球の浸潤も認めなかった。抗 IL-8 抗体は気管支内に投与しても無効であったが、耳静脈内に投与すると再灌流時の好中球の凝集、浸潤を抑制することができた。また IL-8 を気管支内に投与すると、好中球の浸潤が同様に引き起こされた。IL-8 の免疫組織染色によって、細気管支の線毛上皮および肺胞マクロファージが IL-8 を主要に産生している細胞であると判明した。このように肺虚血後再灌流障害時の好中球の浸潤には IL-8 が主要に関与していることを確立した。今後の IL-8 アンタゴニストの開発ならびにその臨床応用が期待される。

**Key words** interleukin-8 (IL-8), ischemia-reperfusion injury, lung transplantation, neutrophil infiltration

近年肺移植は手術手技および免疫抑制療法の進歩により、その成績は飛躍的に向上し、確立した治療手段となりつつある。しかし肺はその構造上の特徴により保存が他の臓器と比べ困難であり、現在臨床で用いられている方法では4~6時間が限界と言われ、肺移植の普及を妨げる要因となっている<sup>1)</sup>。一方、虚血臓器への血流の再開が、機能の回復よりもむしろ更なる組織の障害を引き起こすという現象が、心筋梗塞、脳梗塞、動脈閉塞、ショックなどの循環不全の後に認められ、移植においても問題となっている。肺移植においても虚血後再灌流障害による肺機能の低下は、術後早期の大きな問題点である。虚血後再灌流障害の原因として近年活性酸素の関与が指摘され、活性酸素の消去剤による再灌流障害の軽減も報告させている<sup>2)3)</sup>。活性酸素の産生源としてはキサンチンオキシダーゼ系、好中球 NADPH オキシダーゼ系、アラキドン酸代謝系などがあげられる。このうち好中球は活性酸素のみならずプロテアーゼ、フォスホリパーゼの産生源としても働いていると考えられている<sup>4)~6)</sup>。また虚血後再灌流障害を起こした肺においては細血管に好中球の塞栓がみられ、再灌流時のいわゆる非再血流現象 (no reflow phenomenon) にも好中球の関与がいわれている<sup>7)</sup>。虚血後再灌流障害の防止として、白血球除去や白血球の血管内皮への接着阻止が有効であったという報告もなされ<sup>7)~9)</sup>、好中

球が虚血後再灌流障害において重要な役割を果たしていると考えられている。

虚血後再灌流障害に限らず組織損傷時には、生体反応としての炎症反応が起き、局所には白血球が浸潤してくる。この白血球浸潤機構は実に複雑であり、多種の因子により制御されるものと考えられている。白血球を最終的に炎症局所へ導く因子が遊走因子として総称されており、活性化補体第5成分、ロイコトリエン  $B_4$  (leukotrien  $B_4$ , LTB<sub>4</sub>)、そして種々のサイトカインなどが知られている。最近、好中球に対して強い遊走能を持つ新しいサイトカインが単離精製された。

インターロイキン-8 (Interleukin-8, IL-8) は、リポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激ヒト末梢血単核球の培養上清より精製された、好中球遊走活性をもつサイトカインである<sup>10)</sup>。IL-8 蛋白質は成熟型で72個のアミノ酸よりなり分子量は約8,000である。IL-8 は好中球に対しては走化性のみならず、リゾーム酵素の放出、スーパーオキシドの産生の誘導などの活性化にも働くことが試験管内の実験から明らかとなっている<sup>11)~13)</sup>。生体内では皮内投与<sup>14)15)</sup>、静脈内投与<sup>16)17)</sup>、関節腔内投与<sup>18)</sup>のいずれの系においても、大量の好中球の投与部位への動員が起きることが報告されている。またリウマチ性関節炎<sup>19)</sup>、成人呼吸窮迫症候群、敗血症<sup>20)</sup>などで患部や血中に IL-8 が検出

Abbreviations: AM, alveolar macrophage; BALF, broncho-alveolar lavage fluid; BSA, bovine serum albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IL-1, interleukin-1; IL-8, interleukin-8; LT, leukotrien; PAF, platelet activating factor; PBS, phosphate buffer saline; SOD, superoxide dismutase; TNF, tumor necrosis factor

されており、好中球の浸潤を伴った諸疾患での IL-8 の関与が想定されている。

そこで筆者は肺虚血後再灌流障害における好中球の浸潤に IL-8 が関与しているか、また関与しているならば抗 IL-8 抗体により再灌流障害の防止が可能かどうかを、ウサギ実験モデルを用いて検討した。

#### 対象および方法

##### I. 実験動物

実験には、体重 2.5~3.0kg の New Zealand White 種の雌性



Fig. 1. Diagram of the experimental procedure. 4-0 Prolene ligatures were passed around the pulmonary hili on the both sides. The rabbit lung was made ischemic by clamping the tourniquet.

ウサギ (三協ラボサービス, 東京) 42羽を用いた。まず前投薬として硫酸アトロピン (田辺, 東京) 0.5mg を筋肉内注射した。耳介の静脈に点滴路を確保し、ペントバルビタールナトリウム (アボット, イリノイ, 米国) 25mg/kg を緩徐に静脈内注入した。手術台に仰臥位で固定し、前頸部および前胸腹部を剃毛した。前頸部縦切開にて気管を露出後、気管切開により経 3.5 mm の気管内挿管チューブを約 1.5cm 挿入固定し、人工呼吸器に接続した。人工呼吸器は Harvard 型人工呼吸器を使用し、酸素濃度 50%, 1 回換気量 15~20ml/kg, 換気回数毎分 30 回に設定した。人工呼吸器が接続されると同時に臭化パンクロニウム (オルガノン, アムステルダム, オランダ) 1mg およびジアゼパム (武田, 大阪) 2mg を静脈内投与した。また補液は 5% 乳酸リンゲル液 (大塚, 東京) を 5ml/kg/hr で行い、維持麻酔として塩酸ケタミン (三共, 東京) を 10mg/hr の濃度で持続点滴静注した。さらに麻酔深度を維持するために、臭化パンクロニウムおよびジアゼパムを適宜静注した。

##### II. 実験系の作製

前胸部正中を胸骨上端より剣状突起まで皮切を加えた。剣状突起を上端で横切開し、切開部より胸骨後面を剝離して、胸骨を正中線上で縦切開した。開胸器にて胸壁を左右に開大し、メスにて胸膜を破り、左右の肺門各々に 4-0 プロレン糸を用いてターニケットを回した (図 1)。その時点でヘパリンナトリウム (ノボ, コペンハーゲン, デンマーク) 200単位/kg を静脈内投与し全身ヘパリン化した。一側のターニケットを遮断する時には、遮断する側の肺が十分に膨らんだ状態で行い、またその際 1 回換気量を 8~10ml/kg に下げた。左肺を対象として以下の 4 群の実験系を作成した。

##### 1. 対照群

対照として、左肺虚血を行わず右肺門ターニケットを遮断し

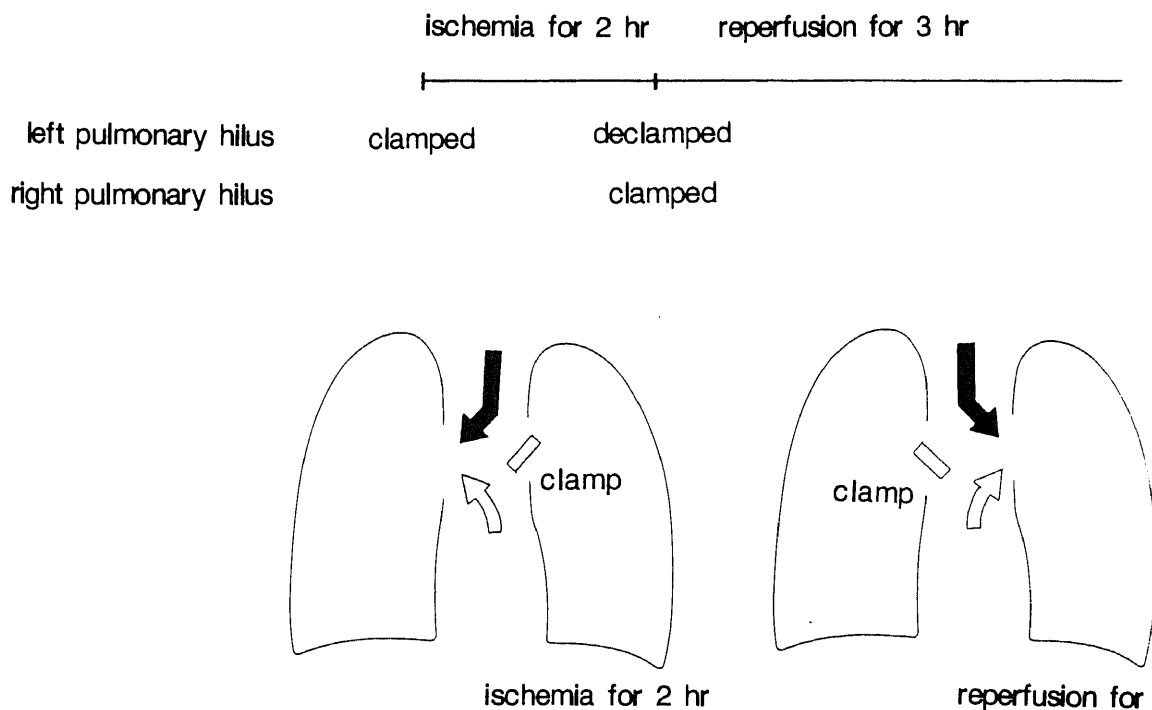


Fig. 2. Method of ischemia and reperfusion. First, the tourniquet of the left pulmonary hilus was clamped and the left lung was made ischemic for 2 hr. Then the tourniquet of the left hilus was de-clamped and that of the right hilus was clamped. All ventilation and blood flow were directed towards the left lung during 3-hr reperfusion. (➡), ventilation flow; (⇨), blood flow.

左肺のみによる灌流を5時間行った群(3羽)および左肺門ターニケットを遮断し5時間の左肺虚血のみを行った群(3羽)をおいた。

## 2. 虚血後再灌流群(図2)

まず左肺門のターニケットを遮断し、左肺の常温2時間においた虚血を開始した。2時間の虚血終了後左肺門のターニケットを解放し、左肺の虚脱が改善した時点で今度は右肺のターニケットを遮断、すべての肺循環および換気を左肺のみで行われるようにした。その後最長3時間までの左肺の再灌流を行った。虚血前、再灌流前、再灌流2時間後、3時間後の時点で実験を終了する4つ亜群に分けた(各6羽ずつ)。

## 3. 抗 IL-8 抗体群

上記と同じ左肺虚血再灌流実験において、再灌流開始と同時にマウス抗ウサギ IL-8 モノクローナル中和抗体(WS-4)<sup>21)</sup>を投与する群を作成した。10mgのWS-4を3mlの生理食塩水で希釈し、左気管支内または耳静脈内に注入した後、3時間の再灌流を施行した(各3羽ずつ)。左気管支内への注入は挿管チューブ内に6Frアトム栄養チューブを挿入し、そこから左気管支内へWS-4溶液を散布した。対照実験としてトキソプラズマ細胞膜抗原に対するモノクローナル抗体(TpM-1)<sup>22)</sup>10mgを同様に静注し再灌流した群を作製した(3羽)。

## 4. IL-8 投与群

右肺門のターニケットを遮断した後、挿管チューブを通して挿入された栄養チューブから、3mlの生理食塩水で希釈された3 $\mu$ gの組換え型ウサギ IL-8<sup>23)</sup>を左気管支内に散布した。その後両側のターニケットを解放した状態で2時間の換気を行った(3羽)。

## Ⅲ. 測定

以下、特に会社名の記載のない試薬類は和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。

各実験の終了時点でまず肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid, BALF)を左肺より採取した。その方法は5mlの生理食塩水を挿管チューブより左気管支内に注入し、その液を回収しガーゼでろ過して浮遊物を除いた後、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(ethylene diamine tetraacetic acid-disodium salt, EDTA)1mgの入った試験管に入れよく攪拌した。BALFを採取した後、塩酸ケタミン100mgを急速静注しウサギを屠殺し、左肺を一塊として摘出した。左肺後葉の上端の一部を500mg採取し、0.5%仔牛血清アルブミン、0.05%トウイーン20、リン酸緩衝食塩水(0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.05% tween 20, phosphate buffer saline (PBS), 0.5% BSA, tween-PBS)1ml中で、注射器および20ゲージ針を用いて十分ホモジネートした。その後3000回転、15分間遠心し、上清のみを取り測定までは-80℃で保存した。その後以下の項目について測定した。

## 1. BALF 中の細胞数およびその分画

まずBALFを1500回転、15分間遠心し、上清は別のチューブに移し後の測定まで-80℃で保存しておいた。沈渣はRPMI-1640培地(日本製薬、東京)にて2度洗い、その後低張生理食塩水にて赤血球を溶血させ、再び遠心し、沈渣を100 $\mu$ lのRPMI-1640培地で溶解し細胞浮遊液とした。BALF中の細胞数はこの細胞浮遊液をトリパンブルー液で希釈し、Burker-Turk型計算盤(エルマ、東京)を用いて算出した。また細胞分画は細胞浮遊液をスライドガラスに塗抹し、ディフ・タイック

(国際試薬、神戸)にて染色し、顕微鏡にて200倍の倍率で200~400個の細胞を数えその比率を算出した。

## 2. BALF および組織中の IL-8 濃度(図3)

BALF 上清および左肺組織ホモジネート上清中の IL-8 濃度の測定は、酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>21,23)</sup>にて行った。まず一次抗体として WS-4 を 0.05M炭酸緩衝液(pH 9.6)にて0.5 $\mu$ g/mlの濃度に希釈し、96穴マイクロタイタープレート(ヌンク、コペンハーゲン、デンマーク)の各穴に100 $\mu$ lずつ加え4℃で一晩インキュベートした。0.05%トウイーン20、リン酸緩衝食塩水(tween-PBS)にて3度洗浄した後、1%仔牛血清アルブミン、リン酸緩衝食塩水(1% BSA, PBS)150 $\mu$ lを各穴に加え、37℃で1時間インキュベートした。tween-PBSにて3度洗浄した後、0.5% BSA, tween-PBSにて希釈されたサンプルを100 $\mu$ lずつ加えた。また毎回 IL-8 濃度の標準曲線をつくるため、組み換え型ウサギ IL-8 を13.7~10,000pg/mlの濃度に0.5% BSA, tween-PBSで希釈し、100 $\mu$ lずつ別の穴に加えた。その後プレートを4℃で一晩インキュベートした。tween-PBSにて5度洗浄した後、二次抗体としてモルモット抗ウサギ IL-8 抗体<sup>23)</sup>を3%ポリエチレングリコール6000, tween-PBSで1 $\mu$ g/mlに希釈し、100 $\mu$ lずつ各穴に加え37℃で2時間インキュベートした。tween-PBSにて5度洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗モルモット免疫グロブリンG(バイオマーカー、エルサレム、イスラエル)を0.5% BSA, tween-PBSで3000倍に希釈し、100 $\mu$ lずつ各穴に加え37℃で2時間インキュベートした。tween-PBSにて5度洗浄した後、p-ニトロフェニールリン酸二ナトリウムをジエタノールアミンで1mg/mlの濃度に希釈し、100 $\mu$ lずつ各穴に加え室温で30分間インキュベートした。反応を止めるため1規定水酸化ナトリウムを100 $\mu$ lずつ各穴に加え、マイクロプレートリーダー(東ソー、山口)にて405nmにおける吸光度を測定し、標準曲線をもとにサンプル中の IL-8 濃度を算出した。測定はすべて重複(duplicate)で行い、検出感度は20pg/mlであった。

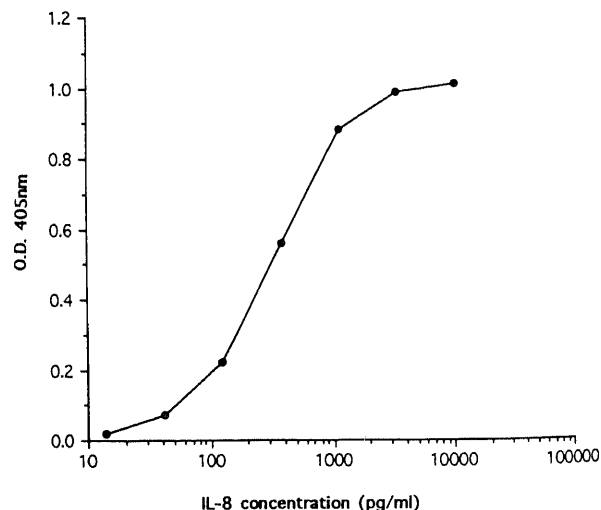


Fig. 3. Standard curve of the recombinant rabbit IL-8 ELISA. In every measurement the calibration curve was established, ranging from 13 to 10,000 pg/ml IL-8. A representative curve is shown. O. D. 405 nm, optical density at 405 nm.

### 3. 血漿 IL-8 濃度

2時間虚血後3時間再灌流の実験モデルにおいて、麻酔開始より実験終了まで30分毎に耳動脈より1mlずつ採血し、ヘパリンナトリウム10単位入りの試験管に入れた。1500回転、15分間遠心し血漿を分離し、測定までは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。IL-8濃度は上記と同じELISAにより測定した。

### IV. 病理組織学的検討

実験終了後摘出された左肺は10%緩衝ホルマリンにて直ちに固定し、これらのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H & E) 染色を施行した。

### V. 免疫組織化学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin complex-peroxidase, ABC-Po) 法にて行った。パラフィン包埋切片をキシレンにより脱パラし、エタノールで脱水した。1%過酸化水素水を含むメタノールにて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った後、非特異的反応を阻害するため10%ウサギ正常血清を室温にて20分間反応させた。一次抗体として $40\mu\text{g/ml}$ に希釈したWS-4を $4^{\circ}\text{C}$ にて一晩反応させた。試薬対照として同濃度に希釈した抗トキソプラズマ細胞膜抗体 (TpM-1) をWS-4のかわりに用いて同様の染色操作を行った。二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウスIgG (ニチレイ, 東京) を室温にて30分間反応させた。次に酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) を室温にて30分間反応させた。各反応の後に $0.01\text{M}$ -PBSにて5分間、4回の洗浄を行った。発色はジアミノベンチジン-テトラヒドロクロライドを主成分としたペルオキシダーゼ発色基質 (協和メディクス, 東京) を用いた。核染色はメチルグリーンにて行い、脱水、キシロール透徹の後、封入し検鏡した。

### VI. 統計学的検討

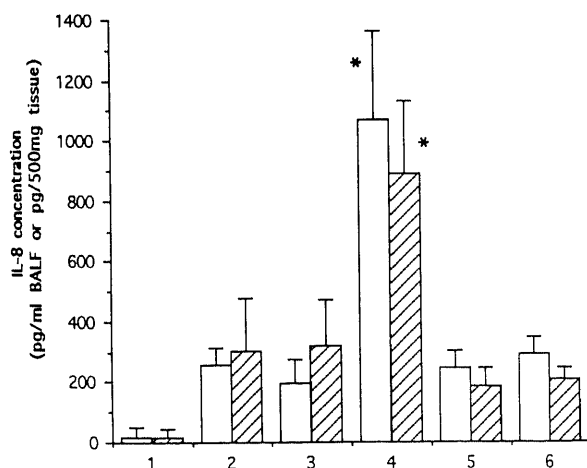


Fig. 4. Interleukin-8 (IL-8) levels in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) (□) and tissue homogenate (▨). Rabbit left lungs were made ischemic for 2 hr followed by 3-hr reperfusion. At the time described below rabbits were killed and BALF and lung tissue were harvested and assayed for IL-8. 1, before ischemia; 2, after 2-hr ischemia (before reperfusion); 3, after 2-hr reperfusion; 4, after 3-hr reperfusion. Rabbit left lungs were rendered ischemic for 5 hr (5) or perfused for 5 hr (6), and IL-8 levels were assayed likewise. Data are the mean $\pm$ SD from six experiments for 1, 2, 3, 4 and three experiments for 5 and 6. \* $p < 0.05$  as compared with 1, 2 and 3 respectively.

得られた成績はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差 (standard deviation, SD) にて表記した。平均の差の検定には1元配置分散分析法を用い、危険率5%未満をもって有意差ありとした。

## 成 績

### I. 虚血後再灌流実験における IL-8 濃度の変化

#### 1. 血漿中 IL-8 濃度

麻酔開始から再灌流3時間後まで全経過を通じて、血漿IL-8濃度は測定感度以下( $<20\text{pg/ml}$ )であった。より局所に近い部位からの血液を得るため再灌流後には左肺静脈よりの採血も試みたが、同様の結果であった。

#### 2. BALF 中の IL-8 濃度 (図4)

虚血前においては2例においてのみ $80.5\text{pg/ml}$ ,  $36.1\text{pg/ml}$ と低値のIL-8濃度を示したが、それ以外は測定感度以下であった。2時間虚血後においては $261\pm 54\text{pg/ml}$ , 2時間再灌流後においては $195\pm 82\text{pg/ml}$ とIL-8濃度の上昇を認めたが、3時間再灌流後にはさらに $1068\pm 293\text{pg/ml}$ と2時間再灌流後までと比べて有意に高いIL-8濃度の上昇を認めた( $p < 0.05$ )。5時間虚血および5時間灌流の実験群を対照として施行しているが、5時間虚血においては $245\pm 59\text{pg/ml}$ と2時間虚血とほぼ同じレベルのIL-8濃度であり、また5時間灌流においても $291\pm 57\text{pg/ml}$ と共に3時間再灌流に比べると低値のIL-8濃度であった。

#### 3. 組織中の IL-8 濃度 (図4)

組織ホモジネート上清中のIL-8濃度はBALF中のIL-8濃度とはほぼ同様の变化を示した。虚血前は2例( $52.4\text{pg/ml}$ ,

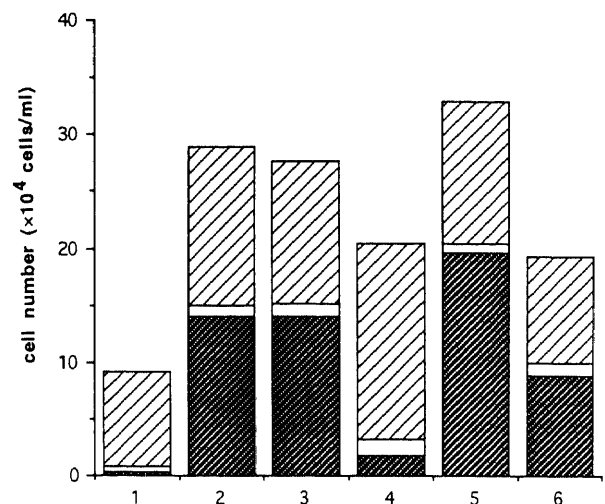
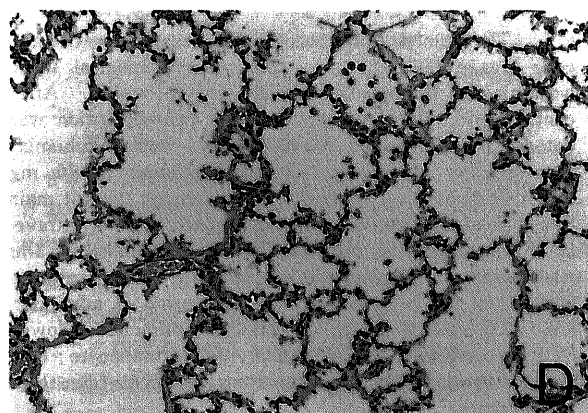
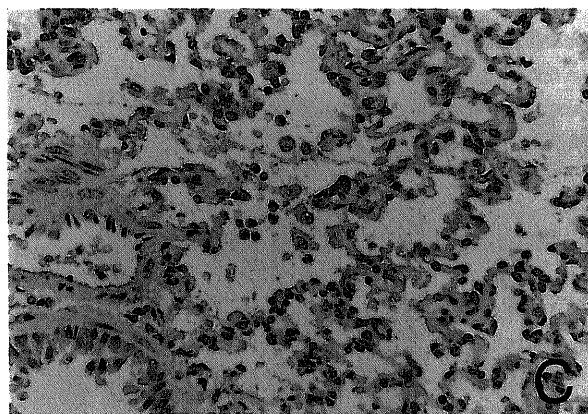
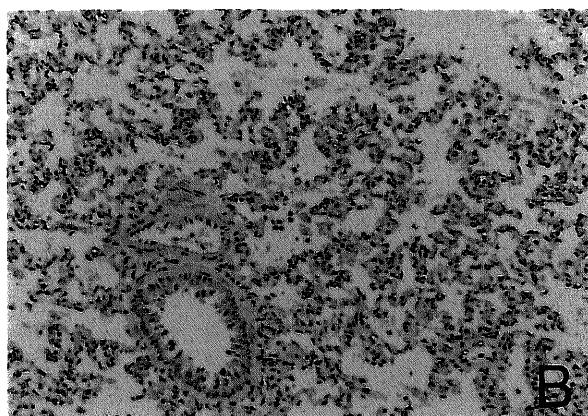
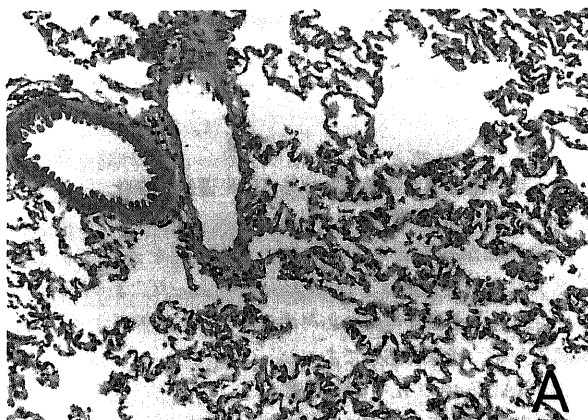


Fig. 5. The number and proportion of cells in broncho-alveolar lavage fluid (BALF). 5 ml of physiological saline was injected through the trachea and recovered. After centrifugation cells were counted and cell proportion was determined by counting 200-400 cells. 1, before ischemia; 2, after 3-hr reperfusion; 3, administration of 10 mg anti-IL-8 monoclonal antibody (WS-4) through the left main bronchus at the beginning of 3-hr reperfusion; 4, intravenous injection of 10 mg WS-4 at the beginning of 3-hr reperfusion; 5, intravenous injection of control antibody (TpM-1) at the beginning of 3-hr reperfusion; 6, administration of  $3\mu\text{g}$  IL-8 through the left main bronchus followed by 2-hr perfusion. (▨), neutrophil; (□), lymphocyte; (▤), alveolar macrophage. Data represent the mean from three experiments.



64.8pg/ml) 以外は測定感度以下であった。2時間虚血後, 2時間再灌流後, 3時間再灌流後の IL-8 濃度はそれぞれ  $304 \pm 173$  pg/ml,  $322 \pm 152$  pg/ml,  $890 \pm 242$  pg/ml であり, 3時間再灌流後では2時間再灌流後までに比べて有意に高値の IL-8 濃度であった ( $p < 0.05$ )。5時間虚血, 5時間灌流においてはそれぞれ  $185 \pm 63$  pg/ml,  $208 \pm 39$  pg/ml であった。

## II. BALF 中の細胞の変化 (図5)

5ml の生理食塩水注入により 2.2~2.8ml の肺胞洗浄液を回収することができた。

### 1. 虚血後再灌流による変化

虚血前のウサギ正常肺における BALF では細胞数 ( $\times 10^4$  cells/ml, 以下特に指定ない場合同単位) は  $9.1 \pm 2.1$  であった。そのうちわけは肺胞マクロファージ (alveolar macrophage, AM) 91.2%, 好中球 3.3%, リンパ球 5.5% であり, 実数ではそれぞれ  $8.3 \pm 2.3$ ,  $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.2$  であった。3時間再灌流後には細胞数  $29.0 \pm 2.2$  と増加しており, そのうちわけも AM

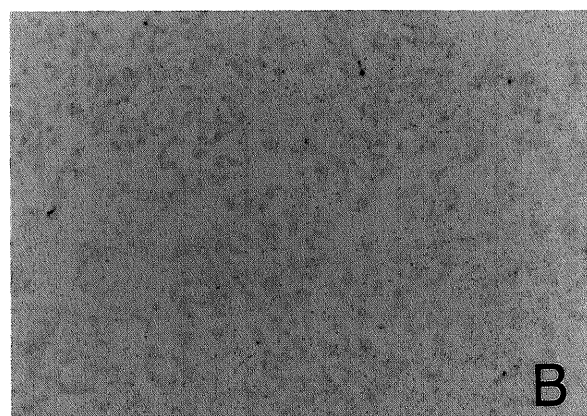


Fig. 7. Immunohistochemical staining for interleukin-8 (IL-8). Rabbit left lung was made ischemic for 2 hours followed by 3-hr reperfusion. The histological section of the lung was stained for IL-8. A, stained with anti-IL-8 monoclonal antibody ( $\times 200$ ); B, stained with control antibody (TpM-1) ( $\times 200$ ).

Fig. 6. Histological appearance of the rabbit lung stained with hematoxylin and eosin. A, normal rabbit lung (before ischemia) ( $\times 200$ ); B, after 3-hr reperfusion ( $\times 200$ ); C, ( $\times 400$ ); D, intravenous injection of anti-IL-8 monoclonal antibody (WS-4) at the beginning of 3-hr reperfusion ( $\times 200$ ).

48.3%, 好中球48.6%, リンパ球3.1%と好中球の比率が著明に増大していた。実数でみても AM  $14.0 \pm 0.5$ , 好中球  $14.1 \pm 2.2$ , リンパ球  $0.9 \pm 0.2$  と好中球が著明に増加し, また AM も正常時と比べ増加していた。

## 2. 抗 IL-8 抗体 (WS-4) の影響

WS-4 を再灌流開始時に左気管支内に注入した群においては, 総細胞数  $27.7 \pm 2.1$  であり, その分画は AM 45.5%, 好中球50.5%, リンパ球4.0%と抗体非投与群と比べ有意の差は認めなかった。一方, WS-4 を再灌流開始時に耳静脈内投与した群においては細胞数  $20.3 \pm 3.3$  であり, そのうちわけは AM 84.7%, 好中球8.4%, リンパ球6.9%と, 好中球の比率が3時間再灌流群や左気管支内投与群に比べ著明に減少していた。また実数でも AM  $17.2 \pm 3.0$ , 好中球  $1.7 \pm 0.5$ , リンパ球  $1.4 \pm 0.2$  と, 好中球の増加が3時間再灌流群に比べ明らかに抑制されていた。対照として TpM-1 を耳静脈内投与した群においては, 総細胞数  $33.0 \pm 6.3$  であり, その分画は AM 38.3%, 好中球59.3%, リンパ球2.4%と好中球の増加は抑制されなかった。この結果, 虚血後再灌流時における BALF 中の好中球増加が WS-4 の静脈内投与により選択的に抑制できたといえる。

## 3. IL-8 気管支内投与による影響

IL-8 単独投与によって再灌流障害に類似した病態が生じるか否かを検討するために, IL-8 ( $1 \mu\text{g}$ ) を左気管支内に注入し2時間換気をする実験を行った。細胞数は  $19.3 \pm 6.9$  であり, そのうちわけは AM 48.7%, 好中球45.6%, リンパ球5.7%であった。実数では AM  $9.4 \pm 3.3$ , 好中球  $8.8 \pm 4.5$ , リンパ球  $1.1 \pm 0.3$  と, 正常肺においてのものと比べて好中球の増加が認められた。

## Ⅲ. 病理組織学的所見 (図6, 表1)

2時間虚血後においては虚血前と比較して特に有意な変化はなく, 2時間再灌流後においても軽度の肺うっ血を認めるのみであった。3時間再灌流後においては, 肺の細血管内に著明な好中球の凝集がみられ, 間質さらには肺胞内への好中球の浸潤も認めた。肺胞内にはフィブリンおよび赤血球の浸出がみられ肺水腫の状態であり, 肺胞構造の破壊も著明であった。また肺胞マクロファージも増加していた。WS-4 を気管支内投与した

群においては同様な所見であったが, 静脈内に投与した群において好中球の凝集と浸潤は抑制されており, 肺胞構造も比較的保たれていた。ただし肺胞マクロファージの増加と軽度の肺水腫は認めていた。TpM-1 を静脈内投与した群においては好中球の凝集, 浸潤は抑制されなかった。IL-8 を気管支内に投与した群においては肺胞構造の破壊はほとんど認めなかったが, 間質, 実質への好中球の浸潤が中等度に認められた。

## Ⅳ. 免疫組織化学的所見 (図7)

3時間再灌流後のウサギ肺の免疫染色において, 細気管支の線毛上皮および肺胞マクロファージの細胞質で IL-8 蛋白が検出された。試薬対照として TpM-1 を一次抗体として用いたものでは, 染色されなかった。このことから, この免疫染色性は特異的であると考えられた。また虚血前の正常肺での IL-8 免疫染色では, 上記細胞においても染色性を認めなかった。

## 考 察

虚血後再灌流障害は, 心筋梗塞, 脳梗塞, 腸管膜動脈閉塞, 肺梗塞, 四肢動脈閉塞などにおいて問題とされてきたが, 近年移植技術が進歩しその普及がすすむにつれて, 移植臓器の保存という意味で虚血後再灌流障害がさらに注目されつつある。再灌流障害の原因としては Granger ら<sup>24)</sup>が活性酸素の関与を報告して以来, 各臓器で再灌流障害における活性酸素の重要性がいわれている。活性酸素の産生源としては Granger ら<sup>24)</sup>はヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系 (hypoxanthine-xanthine oxidase 系) が関与していると報告している。すなわち, 虚血組織においては ATP の効率的な再合成が阻害され AMP が蓄積しやすくなり, その結果アデノシン, イノシンを経てハイポキサンチンが増加する。同時にキサンチン脱水素酵素 (xanthine dehydrogenase) は虚血に伴いキサンチン酸化酵素に変換される。再灌流時に酸素が供給されると, 虚血時に蓄積していたハイポキサンチンがキサンチン酸化酵素によってキサンチンに変換されるが, その際酸素よりスーパーオキシド (superoxide) が生成される。次いでスーパーオキシドより過酸化水素やヒドロキシラジカル (hydroxyl radical) などの活性酸素が産生されていくという機構が想定されている。活性酸素の消去剤である

Table 1. Histopathological findings

|   | Normal lung | After 2-hr ischemia | After 2-hr reperfusion | After 3-hr reperfusion | WS-4 i.b. | WS-4 i.v. | TpM-1 i.v. | IL-8 i.b. |
|---|-------------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| Increase of alveolar macrophage               | —           | —                   | +                      | ++                     | ++        | ++        | ++         | —         |
| Intravenous neutrophil aggregation            | —           | —                   | —                      | ++                     | ++        | —         | ++         | +         |
| Neutrophil infiltration into the interstitium | —           | —                   | —                      | ++                     | ++        | —         | ++         | +         |
| into the alveoli                              | —           | —                   | —                      | ++                     | ++        | —         | ++         | +         |
| Pulmonary edema                               | —           | —                   | +                      | ++                     | ++        | +         | ++         | —         |
| Alveolar destruction                          | —           | —                   | —                      | ++                     | ++        | +         | ++         | —         |

WS-4 i.b. and WS-4 i.v., administration of 10 mg anti-IL-8 monoclonal antibody (WS-4) through the left main bronchus or into the ear vein at the beginning of 3-hr reperfusion; TpM-1 i.v., intravenous injection of control antibody (TpM-1) at the beginning of 3-hr reperfusion; IL-8 i.b., administration of  $3 \mu\text{g}$  IL-8 through the left main bronchus followed by 2-hr perfusion. Histopathological findings are scored, as (—) for no change, (+) for increase and (++) for strong increase.



スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) やカタラーゼ (catalase)<sup>25-27)</sup>, さらにキサンチン酸化酵素の阻害剤であるアロプリノール<sup>27-29)</sup>の投与によって再灌流障害が抑制されたという報告によりこの説は支持された。しかし細胞質内に存在しているキサンチン酸化酵素に対して、高分子のため細胞内に侵入することのできない SOD が消去剤として働くとは考えにくく、またアロプリノールはキサンチン酸化酵素の阻害よりもむしろヒドロキシラジカルの消去として働いているとの報告もみられ<sup>30)</sup>, 主たる活性酸素の起源を他に考慮する必要があった。

近年、活性酸素の産生源として好中球 NADPH オキシダーゼ系が新たに注目されている<sup>31)</sup>。好中球が細菌などを貪食する際に、大量の酸素を消費し活性酸素を産生すること (respiratory burst) は古くからよく知られている。好中球などの食細胞の細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼは、細菌などを貪食すると活性化され、酸素を還元しスーパーオキシドを生成する作用があるためである。次いで SOD により過酸化水素を生じ、好中球の膜にあるミエロペロキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) の作用で過酸化水素と塩素イオンより次亜塩素酸 (HOCl) が生じ、これら細胞毒性の強い物質が細菌の破壊を行うのである。この好中球による活性酸素の産生は、細菌の貪食時以外にもエンドトキシン、補体、ロイコトリエン、種々のサイトカインなどが刺激となって引き起こされる。本来は生体防御機構として働く活性酸素産生機能が、過剰に作用することにより組織に対してはむしろ傷害を与える方向に働くことがある。

もうひとつの活性酸素の産生源として近年注目されているものとして、アラキドン酸代謝系があげられる<sup>32)</sup>。アラキドン酸は細胞膜のリン脂質のグリセロール骨格にエステル結合して存在しているが、虚血により活性化されたフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> によりこのエステル結合が加水分解されると、アラキドン酸は細胞膜より遊離してくる。このアラキドン酸はプロスタグランジン (prostaglandin, PG) とロイコトリエン (leukotriene, LT) へと代謝されていくが、その過程においてヒドロキシラジカルが産生される。また代謝産物であるトロンボキサン A<sub>2</sub> は血小板凝集と動脈収縮作用をもち再灌流時の血流障害をもたらすし、ロイコトリエン B<sub>4</sub> は好中球に対する強力な遊走能をもち、ともにさらなる再灌流障害を引き起こしうる。

このように好中球は再灌流障害時における活性酸素の産生源として重要な位置を占めている。井手ら<sup>33)</sup>はイヌの肺虚血後再灌流モデルにおいて、白血球フィルターを使用した末梢好中球除去が再灌流肺組織の活性酸素産生抑制に有効であり、同時に肺組織障害を軽減しえたと報告している。また抗白血球抗体やヒドロキシウレア (hydroxyurea) を用いた好中球除去の実験系においても、再灌流障害が抑制されたことが報告されている。活性化された好中球は活性酸素以外に、蛋白・リン脂質・コラーゲンなどに対する分解酵素を産生し、これらの相乗的作用により血管内皮細胞などに傷害を与え再灌流障害を促進させる。堀口ら<sup>9)</sup>はイヌの虚血後再灌流モデルにおいて、プロテアーゼ阻害剤の投与により肺血管抵抗の上昇および肺水腫が有意に抑制され、また長期生存を得ることができたと報告している。また再灌流時にはいわゆる非再血流現象といわれる血行の再開にもかかわらず実際の組織の血流量は回復しないという現象がみられるが、これは好中球が細血管の内皮細胞に接着、凝

集し微小循環を障害するために起こる現象であり、ここでも好中球が重要な役割をはたしている。Bishop ら<sup>7)</sup>は虚血後再灌流時の肺血管抵抗の上昇は、初期は血管内皮細胞の腫脹や血管攣縮によるが、数時間後には好中球の血管内皮への接着、凝集が原因であり、好中球の接着因子 (CD-18) に対する抗体を投与することによって、肺血管抵抗の上昇および好中球の肺胞内への浸潤を抑制しえたと報告している。

このように虚血後再灌流障害において好中球が主要な役割をはたしていることが明らかになると、好中球を肺に遊走させ活性化するのが何であるのか、またそれはいつ、どの細胞によってつくられるのか、ということが次の関心事となる。虚血後再灌流障害に限らず急性炎症時には局所への好中球の浸潤を伴うが、白血球の組織への浸潤のためには、白血球表面上に適切な細胞接着因子 (Mac-1, LFA-1, Mel-14 など) が発現され、つぎに白血球が血管内皮細胞に付着、内皮細胞間を通過、基底膜を破壊したのちに、炎症局所に向かう必要がある。この複雑な白血球遊走の機構については不明な点も多く、きわめて多種の因子により制御されるものと考えられている。急性炎症時にみられる好中球の遊走、活性化に関与している因子としては、これまでに LTB<sub>4</sub><sup>34)35)</sup>、活性化補体第 5 成分<sup>36)</sup>、スーパーオキシド<sup>37)38)</sup>などが知られているが、その詳しい機構については未だ明らかにされていない。そこで筆者は本研究において、好中球に対して強い遊走能を持つサイトカインである IL-8 に注目し、虚血後再灌流障害時の好中球浸潤における IL-8 の関与について検討した。

IL-8 の試験管内での活性は、好中球に対しては、補体レセプター I 型 (CR-1) や接着因子の Mac-1 などの発現の誘導<sup>39-41)</sup>、未刺激血管内皮細胞への付着の誘導、形態変化、走化性、活性酸素の産生、リソゾーム酵素の放出、LTB<sub>4</sub>産生<sup>42)</sup>などがあげられているが、これらはまさに急性炎症における好中球の浸潤と活性化の過程であり、その多くの部分において IL-8 が関与している可能性を示唆している。生体内における IL-8 の役割を動物実験モデルを用いて検討するために、筆者ら<sup>23)</sup>は本実験に先立ち、組み換え型ウサギ IL-8<sup>43)</sup>を大腸菌で大量発現し、さらにウサギ IL-8 の濃度測定のための ELISA 系を完成させた。このウサギ IL-8 測定系を用い、ウサギ肺虚血後再灌流障害モデルにおける IL-8 の関与を検討した。

BALF 中および組織ホモジネート上清中の IL-8 濃度の時間的経過をみると、2 時間虚血後および 2 時間再灌流後においてはごく低いレベルの IL-8 濃度であったが、3 時間再灌流後においてはそれまでと比べ有意に高い IL-8 濃度を示しており、再灌流開始 2 時間後から 3 時間後の間に肺組織が多量の IL-8 蛋白を産生しこれが BALF に移行したと考えられた。対照実験として施行した 5 時間虚血群の IL-8 濃度は、2 時間虚血後とはほぼ同じレベルであり、虚血のみでは時間を長くしても IL-8 の大量の発現は認めず、3 時間再灌流後における IL-8 の産生は虚血によってではなく虚血後の再灌流によって引き起こされたと考えられた。また 5 時間灌流群においてもその IL-8 濃度は同様に低いレベルであり、全循環血液が片肺に流れるという負荷が IL-8 産生の刺激となったということも否定できる。虚血や灌流のみでも肺組織に対しては侵襲となり、低いながらも IL-8 産生を導いたが、虚血とその後の再灌流という組み合わせは、単なる侵襲という以上の刺激を IL-8 産生に与えたと考えられた。

血漿 IL-8 濃度は全過程を通じて測定感度以下であったが、このことは IL-8 が血液中には入らないか、もしくはごく微量のみしか入らないということになる。血液中に入った IL-8 が急速に分解、吸着された可能性もあるので、再灌流後は左肺静脈からの採血を試みたが同様の結果であり、また IL-8 の血液中での半減期は Van Zee ら<sup>19)</sup>は 7.5 分、われわれの研究では 5.1 分と比較的長く、急速に血液中から消失したという可能性はほぼないといえる。筆者は肺癌手術患者における術中、術後の血漿中 IL-8 濃度を測定したが、ここでも全経過を通じて測定感度以下であった。敗血症性ショックやそれに引き続く成人呼吸窮迫症候群においては、血液中に高濃度の IL-8 が検出されているが、これらの病態は、いかなれば全身性の虚血後再灌流障害であり、その障害が広い範囲で高度に発生するため、IL-8 が大量に産生され血液中にも検出されえたと考えられる。

虚血後再灌流実験において BALF 中の細胞数とその分画の変化をみてみると、IL-8 濃度が増加した 3 時間再灌流後において BALF 中の好中球の比率および数が著明に増加しており、組織中および BALF 中の IL-8 濃度の変動に相関しているといえた。病理組織学的にも再灌流 2 時間後まではほとんど変化を認めなかったが、3 時間後には著明な好中球の浸潤を認めており、BALF 中の細胞および IL-8 濃度の変化とよく相関していた。これらより虚血後再灌流障害時の好中球の細血管での凝集および肺胞への浸潤に IL-8 は強い関連性をもっていると考えられた。実際、IL-8 を気管支内に投与すると、同様な変化が BALF 中の細胞および病理組織学的にも認め得た。IL-8 を皮内や関節腔内に投与すると投与部位に大量の好中球が集積することが知られているが、気管支内投与によっても好中球の血管内凝集および実質、間質への浸潤を引き起こすことが判明した。また IL-8 の静脈内投与によって好中球の肺胞内への浸潤は認めないが、肺の細血管内での凝集は認めたとの報告もみられる<sup>19)</sup>。

抗 IL-8 抗体の静脈内投与により、BALF 中の好中球の増加および組織学的な好中球の血管内凝集、浸潤が選択的に抑制されたが、このことは虚血後再灌流障害時における好中球の浸潤が、まさに IL-8 によって引き起こされたものであることを示している。抗 IL-8 抗体の静脈内投与によって好中球の浸潤のみではなく血管内の凝集も抑制されたことは、IL-8 が好中球の走化・活性化に関与しているのみではなく、好中球の血管内皮への接着にも関与していることを示唆している<sup>39,40)</sup>。抗 IL-8 抗体は気管支内に投与された時には好中球の凝集、浸潤は抑制されなかったが、この投与経路の違いによる効果の差は、抗 IL-8 抗体は肺胞内に投与された場合、不安定かまたは血管内に十分移行できないため好中球の血管内皮への接着を阻害できず、その後の組織への浸潤も抑制できなかったと考えられた。Huber ら<sup>41)</sup>は IL-8 に対する抗血清は試験管内においてレクチン接着因子 (lectin adhesion molecule-1, LECAM-1) と  $\beta$  2 インテグリンの発現を抑制し、好中球の血管内皮への接着を阻害すると報告しており、今回の生体内での結果と一致している。種々の臓器において、好中球の接着因子に対する抗体が虚血後再灌流障害を抑制したとの報告があり<sup>42~47)</sup>、好中球と血管内皮細胞との接着という現象は、好中球浸潤と組織障害のための最初のステップであり重要な意味をもっている。

肺虚血後再灌流障害における好中球の浸潤が IL-8 によって引き起こされていることが判明したが、ここでひとつの問題点

が生じてきた。下肢の虚血後再灌流によって肺に好中球が浸潤し浮腫などの肺障害が起こることは臨床、実験モデルにおいて認められており、実際、下肢動脈血栓症において長期間の虚血の後の血栓摘除は、高度の肺障害を引き起こすため危険であるといわれている。虚血後再灌流によって下肢局所において IL-8 が産生されたとしても、IL-8 が血液中には入らないとしたら、遠隔臓器である肺に好中球の浸潤を引き起こすことは不可能であり、下肢虚血後再灌流における肺の好中球浸潤を IL-8 によって説明することが困難となる。ひとつの可能性は IL-8 以外の好中球遊走因子の存在である。Welbourn ら<sup>4)</sup>は下肢虚血後再灌流時には BALF 中の LTB<sub>4</sub> 濃度が上昇したと報告している。また Goldman ら<sup>35)</sup>は、下肢虚血後再灌流時には血液中の LTB<sub>4</sub> 濃度が上昇しており、再灌流時の活性酸素の消去または好中球の除去は血液中 LTB<sub>4</sub> の上昇を抑え、さらに好中球の浸潤も抑制できたと報告しており、活性酸素の刺激で好中球が LTB<sub>4</sub> を産生するという過程で好中球浸潤を説明している。その他に血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) が好中球の浸潤と活性化に関与しており、その拮抗剤によって再灌流障害が抑制されたとの報告もある<sup>48~50)</sup>。一元的に考えるとしたら次のような説明も可能である。すなわち、虚血後再灌流によって局所にて何らかの物質が産生され、それが血液中に入り肺に到達し、肺での IL-8 産生を刺激したというものである。この物質としては活性酸素と種々のサイトカインが考えられる。すなわち再灌流によって産生された活性酸素が直接またはインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) の産生を経て IL-8 産生を引き起こしたという考えである<sup>51,52)</sup>。種々の臓器の虚血後再灌流障害時において IL-1 や TNF の関与が報告されている<sup>53~56)</sup>。

本実験において IL-8 が虚血後再灌流障害において主要な要素として関与していることが証明されたが、IL-8 単独投与では完全に再灌流障害の病理像を再現できないことから、再灌流障害の成因として IL-8 以外に、活性酸素や種々のサイトカイン、LTB<sub>4</sub>、補体成分などが複雑なネットワークを形成して、虚血後再灌流障害を引き起こしている可能性が考えられる。3 時間再灌流後においては、肺胞マクロファージは BALF 中および病理組織においてその数の増加を認め、また免疫組織染色により IL-8 産生能を証明されている。この活性化された肺胞マクロファージが IL-8 のみならず IL-1, TNF, PAF などの産生にも関与している可能性が高く<sup>57)</sup>、肺胞マクロファージの活性およびこれらの因子の時間的経過を観察しその相互関係を理解することによって、再灌流障害を病態生理学的にさらに詳細に解析することができよう。またこの肺胞マクロファージの増加および活性化に最近新しく単離、精製されたサイトカインである単球走化性・活性化因子 (monocyte chemotactic and activating factor, MCAF)<sup>58)</sup> が関与している可能性もあり、これらサイトカインの複雑なネットワークの全貌を明らかにすることが虚血後再灌流障害の全貌を明らかにすることにつながると信じている。

抗 IL-8 抗体の静脈内投与によって好中球の凝集、浸潤は抑制されたが、再灌流 3 時間以降の長期生存は困難であった。病理組織学的には肺胞内へのフィブリン、赤血球の浸出はより軽度であったが認めており、肺障害による右心不全が死亡の原因と考えられた。これらは活性化マクロファージよりの他のサイトカインおよび好中球以外より起因する活性酸素などの作用に



よると考えられ、肺虚血後再灌流障害は好中球が主たる原因となるが、好中球以外の要素も関与していることをしめしている。

## 結 論

肺虚血後再灌流障害における IL-8 の関与の有無を検討するために、ウサギ肺を用い 2 時間虚血、3 時間再灌流の実験モデルを作製した。さらに抗 IL-8 抗体により虚血後再灌流障害の軽減が可能かどうかを検討し、以下の結論を得た。

1. BALF および組織ホモジネート中の IL-8 濃度は、2 時間再灌流後までに比べ 3 時間再灌流後に有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。また 5 時間虚血あるいは 5 時間灌流のみでは有意な IL-8 濃度の上昇は認めなかった。
  2. 血漿中 IL-8 濃度は実験全経過を通じて測定感度以下であった。
  3. BALF 中の細胞分画は虚血前に比べ 3 時間再灌流後には、好中球の比率および実数が著明に増加し、肺泡マクロファージの数も増加していた。
  4. 病理組織学的には、2 時間再灌流後まではほとんど変化がみられなかったが、3 時間再灌流後には好中球の血管内での凝集および間質、実質内への浸潤を認め、また肺泡構造の破壊も著明であった。
  5. 免疫組織染色により、細気管支の線毛上皮および肺泡マクロファージが主に IL-8 を産生している細胞であると判明した。
  6. IL-8 の気管支内投与により好中球の間質、実質内への浸潤が引き起こされた。
  7. 抗 IL-8 抗体は気管支内に投与しても無効であったが、静脈内に投与すると虚血後再灌流時の好中球の血管内凝集および浸潤を選択的に抑制した。
- 以上より肺虚血後再灌流障害時の好中球浸潤には IL-8 が主要に関与しているといえた。また抗 IL-8 抗体をはじめとした IL-8 アンタゴニストはその抑制に有効であり今後の臨床応用が期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学第一外科講座渡辺洋字教授ならびに金沢大学がん研究所薬理部松島綱治教授に深く感謝の意を表します。また御指導・御助言を戴きました金沢大学がん研究所薬理部向田直史助教授、研究にあたり多大な御協力を戴きました金沢大学がん研究所薬理部秋山萬里子助手、原田明久博士に厚く御礼申し上げます。病理学的所見に関して御協力を戴いた金沢大学医学部第一病理木村顕子博士に感謝いたします。最後に終始御協力を戴きました金沢大学がん研究所薬理部および金沢大学第一外科学教室の諸先生方に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Novick, R. J., Menkis, A. H. & McKenzie, F. N.: New trends in lung preservation: A collective review. *J. Heart Transplant.*, 11, 377-392 (1992).
- 2) Tate, R. M., Vanbenthuyzen, K. M., Shasby, D. M., McMurtry, I. F. & Repine, J. F.: Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 126, 802-806 (1982).
- 3) Kennedy, T. P., Rao, N. V., Hopkins, C.,

Pennington, L., Tolley, E. & Hoidal, J. R.: Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J. Clin. Invest.*, 83, 1326-1335 (1989).

4) Welbourn, C. R. B., Goldman, G., Paterson, I. S., Valeri, C. R., Shepro, D. & Hechtman, H. B.: Neutrophil elastase and oxygen radicals: Synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am. J. Physiol.*, 260, H1852-H1856 (1991).

5) McDonald, R. J., Bruckner, L. V. & Repine, J. E.: Neutrophil elastase augments acute edematous injury in isolated rat lungs perfused with neutrophil cytoplasts. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140, 1825-1827 (1989).

6) 堀口倫博: 肺移植における再灌流障害に対する Urinary Trypsin Inhibitor の効果. *日呼吸器外科会誌*, 6, 481-459 (1992).

7) Bishop, M. J., Kowalski, T. F., Guidotti, S. M. & Harlan, J. M.: Antibody against neutrophil adhesion improves reperfusion and limits alveolar infiltrate following unilateral pulmonary artery occlusion. *J. Surg. Res.*, 52, 199-204 (1992).

8) Pillai, R., Bando, K., Schueler, S., Zebley, M., Reitz, B. A. & Baumgartner, W. A.: Leukocyte depletion results in excellent heart-lung function after 12 hours of storage. *Ann. Thorac. Surg.*, 50, 211-214 (1990).

9) Bando, K., Pillai, R., Cameron, D. E., Brawn, J. D., Winkelstein, J. A., Hutchins, G. M., Reitz, B. A. & Baumgartner, W. A.: Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 99, 873-877 (1990).

10) Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J. J. & Leonard, E. J.: Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: Partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J. Immunol.*, 139, 788-793 (1987).

11) Thelen, M., Peveri, P., Kernen, P., Tschanner, V., Walz, A. & Baggiolini, M.: Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J.*, 2, 2702-2706 (1988).

12) Peveri, P., Walz, A., Dewald, B. & Baggiolini, M.: A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 167, 1547-1559 (1988).

13) Schröder, J. M., Mrowietz, U., Morita, E. & Christophers, E.: Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.*, 139, 3474-3483 (1987).

14) Rampart, M., Damme, J. V., Zonnekeyn, L. & Herman, A. G.: Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am. J. Pathol.*, 135, 21-25 (1989).

15) Larsen, C. G., Anderson, A. O., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K.: Production of interleukin-8 by human

- dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor. *Immunology*, **68**, 31-36 (1989).
- 16) Jagels, M. A. & Hugli, T. E.: Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis: A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J. Immunol.*, **148**, 1119-1128 (1992).
  - 17) Van Zee, K. J., Fischer, E., Hawes, A. S., Hebert, C. A., Terrell, T. G., Baker, J. B., Lowry, S. F. & Moldawer, L. L.: Effects of intravenous IL-8 administration in nonhuman primates. *J. Immunol.*, **148**, 1746-1752 (1992).
  - 18) Endo, H., Akahoshi, T., Takagishi, K., Kashiwazaki, S. & Matsushima, K.: Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res.*, **10**, 245-252 (1991).
  - 19) Brennan, F. M., Zachariae, C. O. C., Chantry, D., Larsen, C. G., Turner, M., Maini, R. N., Matsushima, K. & Feldmann, M.: Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 2141-2144 (1990).
  - 20) Van Zee, K. J., DeForge, L. E., Fischer, E., Marano, M. A., Kenney, J. S., Remick, D. G., Lowry, S. F. & Moldawer, L. L.: IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J. Immunol.*, **146**, 3478-3482 (1991).
  - 21) Ko, Y., Mukaida, N., Panyutich, A., Voitenok, N. N., Matsushima, K., Kawai, T. & Kasahara, T.: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interleukin-8. *J. Immunol. Methods*, **149**, 227-235 (1992).
  - 22) Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri, K., Nakano, K. & Hirano, K.: Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J. Immunol. Methods*, **65**, 75-82 (1983).
  - 23) Harada, A., Sekido, N., Kuno, K., Akiyama, M., Kasahara, T., Nakanishi, N. & Matsushima, K.: Expression of recombinant rabbit interleukin 8 (IL-8) in *Escherichia coli* and establishment of the essential involvement of IL 8 in recruiting neutrophils into lipopolysaccharide-induced inflammatory site of rabbit skin. *Int. Immunol.*, (in print).
  - 24) Granger, D. N., Rutili, G. & McCord, J. M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, **81**, 22-29 (1981).
  - 25) Paull, D. E., Keagy, B. A., Kron, E. J. & Wilcox, B. R.: Reperfusion injury in the lung preserved for 24 hours. *Ann. Thorac. Surg.*, **47**, 187-192 (1989).
  - 26) Grosso, M. A., Brown, J. M., Viders, D. E., Mulvin, D. W., Banerjee, A., Velasco, S. E., Repine, J. E. & Harken, A. H.: Xanthine oxidase-derived oxygen radicals induce pulmonary edema via direct endothelial cell injury. *J. Surg. Res.*, **46**, 355-360 (1989).
  - 27) Horgan, M. J., Lum, H. & Malik, A. B.: Pulmonary edema after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**, 1421-1428 (1989).
  - 28) McCord, J. M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, **312**, 159-163 (1985).
  - 29) Lynch, M. J., Grum, C. M., Gallagher, K. P., Bolling, S. F., Deeb, G. M. & Morganroth, N. L.: Xanthine oxidase inhibition attenuates ischemic-reperfusion lung injury. *J. Surg. Res.*, **44**, 538-544 (1988).
  - 30) Moorhouse, P. C., Grootvelt, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G. & Gutteridge, J. M. C.: Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.*, **213**, 23-28 (1987).
  - 31) Shasby, D. M., Vanbenthuyssen, K. M., Tate, R. M., Shasby, S. S., McMurtry, I. & Repine, J. E.: Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: Role of oxygen radicals. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **125**, 443-447 (1982).
  - 32) 藤田 直, 藤本陽子: フラキドン酸カスケードとラジカル過酸化反応. *日臨*, **46**, 2155-2160 (1988).
  - 33) 井手博文, 井野隆史, 長谷川嗣夫, 松本博志: 肺保存における温阻血再灌流障害に対する白血球除去の効果について. *日外会誌*, **91**, 1023-1030 (1990).
  - 34) Klausner, J. M., Paterson, I. S., Kobzik, L., Valeri, R., Shepro, D. & Hechtman, H. B.: Leukotrienes but not complement mediate limb ischemia-induced lung injury. *Ann. Surg.*, **209**, 462-470 (1989).
  - 35) Goldman, G., Welbourn, R., Klausner, J. M., Valeri, C. R., Shepro, D. & Hechtman, H. B.: Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B<sub>4</sub> synthesis and diapedesis. *Surgery*, **111**, 287-293 (1992).
  - 36) Till, G. O., Johnson, K. J., Kunkel, R. & Ward, P. A.: Intravascular activation of complement and acute lung injury: Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J. Clin. Invest.*, **69**, 1126-1135 (1982).
  - 37) Grisham, M. B., Hernandez, L. A. & Granger, D. N.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.*, **251**, G567-G574 (1986).
  - 38) Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. & McCord, J. M.: Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1159-1163 (1980).
  - 39) Carveth, H. J., Bohnsack, J. F., McIntyre, T. M., Baggiolini, M., Priscott, S. M. & Zimmerman, G. A.: Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 387-393 (1989).
  - 40) Detmers, P. A., Lo, S. K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M. & Cohn, Z. A.: Neutrophil-activating protein/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human

neutrophils. *J. Exp. Med.*, 171, 1155-1162 (1990).

41) Paccaud, J. -P., Schifferli, J. A. & Baggiolini, M.: NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 187-192 (1990).

42) Schröder, J. M.: The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J. Exp. Med.*, 170, 847-863 (1989).

43) Yoshimura, T. & Yuhki, N.: neutrophil attractant/activation protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit: cDNA cloning and their expression in spleen cells. *J. Immunol.*, 146, 3483-3488 (1991).

44) Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, III, R. F. & Weiss, S. J.: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, 254, 99-102 (1991).

45) Vedder, N. B., Winn, R. K., Rice, C. L., Chi, E. Y., Arfors, K. -E. & Harlan, J. M.: Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 2643-2646 (1990).

46) Vedder, N. B., Winn, R. K., Rice, C. L., Chi, E. Y., Arfors, K. -E. & Harlan, J. M.: A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J. Clin. Invest.*, 81, 939-944 (1988).

47) Simpson, P. J., Todd, III, R. F., Fantone, J. C., Mickelson, J. K., Griffin, J. D. & Lucchesi, B. R.: Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mol, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.*, 81, 624-629 (1988).

48) Qayumi, A. K., Jamieson, W. R. E. & Poostizadeh, A.: Effects of platelet-activating factor antagonist CV-3988 in preservation of heart and lung for transplantation. *Ann. Thorac. Surg.*, 52, 1026-1032 (1991).

49) Wahlers, Th., Hirt, S. W., Haverich, A., Fieguth, H. G., Jurmann, M. & Borst, H. G.: Future horizons of lung preservation by application of a platelet-activating factor antagonist compared with current clinical standards:

Euro-Collins flush perfusion versus donor core cooling. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 103, 200-205 (1992).

50) Conte, J. V., Katz, N. M., Wallace, R. B. & Foegh, M. L.: Long-term lung preservation with the PAF antagonist BN 52021. *Transplantation*, 51, 1152-1156 (1991).

51) Rolfe, M. W., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Chensue, S. W., Allen, R. M., Evanoff, H. L., Phan, S. H. & Strieter, R. M.: Pulmonary fibroblast expression of interleukin-8: A model for alveolar macrophage-derived cytokine networking. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 5, 493-501 (1991).

52) DeForge, L. E., Kenney, J. S., Jones, M. L., Warren, J. S. & Remick, D. G.: Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood: Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J. Immunol.*, 148, 2133-2141 (1992).

53) Caty, M. G., Guice, K. S., Oldham, K. T., Remick, D. G. & Kunkel, S. I.: Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann. Surg.*, 212, 694-700 (1990).

54) Colletti, L. M., Remick, D. G., Burtch, G. D., Kunkel, S. L., Strieter, R. M. & Campbell, D. A.: Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.*, 85, 1936-1943 (1990).

55) Welbourn, R., Goldman, G., O'riordain, M., Lindsay, T. F., Paterson, I. S., Kobzik, L., Valeri, C. R., Shepro, D. & Hechtman, H. B.: Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J. Appl. Physiol.*, 70, 2645-2649 (1991).

56) Ascer, E., Moham, C., Gennaro, M. & Cupo, S.: Interleukin-1 and thromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Ann. Vasc. Surg.*, 6, 69-73 (1992).

57) Sibille, Y. & Reynolds, H. Y.: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141, 471-501 (1990).

58) Matsushima, K., Baldwin, E. T. & Mukaida, N.: Interleukin-8 and MCAF: Novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chem. Immunol.*, 51, 236-265 (1992).

**Role of Interleukin-8 (IL-8) in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rabbit Lungs** Nobuaki Sekido, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **102**, 202—213 (1993)

**Key words** interleukin-8 (IL-8), ischemia-reperfusion injury, lung transplantation, neutrophil infiltration

#### Abstract

Ischemia-reperfusion injury remains a significant problem in lung transplantation. Neutrophils are considered a major etiologic factor in reperfusion injury. To determine the role of interleukin-8 (IL-8) in reperfusion lung injury, rabbit lungs were rendered ischemic for 2 hr followed by 3-hr reperfusion. The present study also evaluated the ability of anti-IL-8 antibody to reduce reperfusion lung injury. Reperfusion for 3 hr increased the levels of IL-8 in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and tissue homogenate significantly, compared with reperfusion for 2 hr or less ( $p<0.05$ ). Corresponding to the elevation of IL-8 levels, the number and proportion of neutrophils in cells in BALF increased with the histopathological evidence of intravascular neutrophil aggregation and neutrophil infiltration. Neither ischemia for 5 hr alone nor perfusion for 5 hr alone induced IL-8 elevation and neutrophil infiltration. Injection of anti-IL-8 antibody into the ear vein inhibited the intravenous neutrophil aggregation and neutrophil infiltration. In contrast, intrabronchial administration was ineffective. Intrabronchial administration of IL-8 caused neutrophil infiltration into the interstitium and the alveoli. Immunohistochemical staining revealed that the original cells producing IL-8 were ciliary cells of bronchiole and alveolar macrophages. These findings proved that IL-8 plays a major role in the recruitment of neutrophils in reperfused rabbit lungs. It is expected that antagonists against IL-8 are clinically useful for inhibiting ischemia-reperfusion lung injury.